

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 195 00 683 A 1

61 Int. Cl.⁸:
B 01 D 57/02
G 01 N 27/447
B 01 J 19/08
C 12 N 13/00

21 Aktenzeichen: 195 00 683.6
22 Anmeldetag: 12. 1. 95
43 Offenlegungstag: 13. 6. 96

DE 195 00 683 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31

10.12.94 DE 94 20 738.0

71 Anmelder:

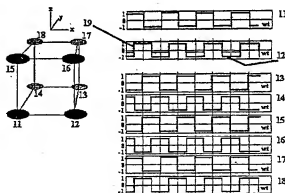
Fuhr, Günter, Prof. Dr., 13127 Berlin, DE

72 Erfinder:

gleich Anmelder

54 Trapping von Molekülen und Mikropartikeln in Feldkäfigen

57 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Trapping und Positionieren von geladenen Molekülen und/oder Mikropartikeln durch Kombination feedbackgesteuerter Gleichspannungs- oder Niederfrequenzsignale mit Hochfrequenzsignalen in 3-dimensionalen Mikrostrukturen, die aus ultraminiaturisierten Elektroden bestehen. Durch die Kombination dielektrischer Kräfte, hervorgerufen durch die Hochfrequenzsignale, und elektrophoretischer Kräfte, hervorgerufen durch die Gleichspannungsanteile werden Moleküle und Mikropartikeln mit einer Genauigkeit im Mikrometerbereich oder darunter in einem flüssigen Medium positioniert, stabil levitiert oder/und bewegt. Das Verfahren und die Vorrichtung ist Bestandteil optischer und elektrischer Anordnungen zur Vermessung entsprechender Teilchen.



DE 195 00 683 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Trapping und der gesteuerten Bewegung von Mikropartikeln und Molekülen in flüssigen Medien mittels elektrisch induzierter Kräfte.

Zum Stand der Technik gehören 4-polige oder 6-polige Anordnungen zur feedback-gesteuerten Bewegung kleiner geladener Moleküle, um auf dem Weg elektro-phoretischer Bewegung eine definierte Lage eines Moleküls oder Partikels in einem Lösungsmittelraum zwischen den Elektroden einzunehmen und z. B. eine Korrelationspektroskopie auszuführen (EIGEN und RIEGLER, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 (1994) 5740—5747). Grundprinzip einer solchen Anwendung ist es, daß durch thermische Stöße hin und herbewegte Moleküle oder Mikropartikeln durch feedback-kontrollierte Gleichspannungsansteuerung eines Teils der Elektroden immer wieder in den zentralen Meßbereich der Anordnung zurückgeführt werden. Eine feedback-Steuerung ist erforderlich, da das Teilchen ansonsten unverzüglich an eine der Elektroden gezogen und dort anhaften würde.

Nachteilig an diesem Prinzip ist das Trapping nur jeweils eines Teilchens, da die feedback-Steuerung die statistischen Bewegungen verschiedener Teilchen nicht ausgleichen kann. Ein weiteres Problem entsteht, wenn das Teilchen durch thermische Stöße aus dem mikroskopisch kleinen Beobachtungsbereich gerät, da ohne Beobachtung der Teilchenbewegungen keine gezielte Rückführung möglich ist. Hinzu kommt, daß die produzierten Kräfte das Teilchen zu der der Elektrode entgegengesetzten Polarität ziehen, ein Elektrodenkontakt jedoch unbedingt vermieden werden muß. Das erläuterte Verfahren ist auch nicht für ungeladene Moleküle und Teilchen anwendbar.

Ebenfalls zum Stand der Technik gehören Mikrofeld-käfige, die mit hochfrequenten Signalen angesteuert werden (SCHNELLE et al., Biochim. Biophys. Acta 1157 (1993) 127—140). Obwohl die Anordnung der Elektroden dem o.g. Beispiel sehr ähnlich ist, handelt es sich hierbei um ein anderes Prinzip (Dielektrophorese, vgl. POHL, Dielektrophorese, Cambridge University Press, 1978). Die Kraftentwicklung entsteht dadurch, daß das Hochfrequenzfeld, in der Regel kHz- bis MHz-Frequenz, zu einer Polarisation der Mikropartikeln führt. Die Wechselwirkung des elektrischen Feldes mit den am Mikropartikel induzierten Grenzflächenpolarisationsladungen führt dazu, daß sich das Teilchen im inhomogenen Feld bewegt. Die Kräfte werden in der Literatur als "dielektrophoretisch" bezeichnet (POHL, ebenda). Zur Erzeugung von Partikelströmen in wässrigen Lösungen sind negative dielektrophoretische Kräfte (von den Elektroden abstoßende Wirkung auf das Teilchen) und mit kleiner werdendem Partikelradius auch stärker inhomogenen Felder erforderlich. Bei Einhaltung bestimmter Randbedingungen lassen sich in 3-dimensionalen Halbleiterstrukturen mikrometer- und submikrometergroße Elektroden Systeme als geschlossene Hochfrequenzfeldkäfige erzeugen, in denen einzelne oder Gruppen von Teilchen gefangen und frei schwebend in einer Lösung gehalten werden (SCHNELLE et al., Biochim. Biophys. Acta 1157 (1993) 127—140, Patentanmeldung P443883.5. Mittels dieses Prinzips können sowohl geladene als auch ungeladene Teilchen in Richtung eines Feldminimums bewegt werden. Die abstoßenden Kräfte erfordern auch keine feedback-Kontrolle. Hinzu kommt, daß die elektrische Belastung der Teilchen im

Hochfrequenzbereich sehr gering ist.

Nachteilig an diesem Prinzip ist die Abnahme der Polarisationskräfte mit dem Volumen der Teilchen. Daraus folgt, daß kleine Moleküle nicht mehr stabil gefangen werden können. Auch die selektive Bewegung eines einzelnen Teilchens bei Vorhandensein mehrerer Teilchen ist nicht möglich. Man hat aus diesem Grunde bisher ausgeschlossen, nach diesem Prinzip Moleküle fangen zu können (POHL, Dielektrophorese, Cambridge University Press, 1978).

Beide Feldkäfigprinzipien stehen in bezug zu den entsprechenden Elektrodenanordnungen der Elementarteilchenphysik (PAULsche Käfige, PAUL et al., Forschungsbericht des Wirtschaftsministeriums Nordrhein-Westfalen No. 415 und No. 450 (1958), sind jedoch nicht identisch mit diesen. Im Unterschied zu den physikalisch genutzten Feldkäfigen im Vakuum sind die o.g. Systeme mit einer Flüssigkeit (Wasser etc.) gefüllt. Die dämpfende Wirkung der Flüssigkeit verlangt keinen zusätzlichen Drehimpuls, wie er beim Elementarteilchen-Trapping erforderlich ist. Das läßt sich zum einen durch die bewegungsdämpfende Wirkung der Flüssigkeit, zum anderen das Auftreten echter Feldminima in den Hochfrequenzkäfigen anstatt von Sattelpunkten in den PAUL'schen Elementarteilchenfallen begründen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren anzugeben, mit dem sowohl einzelne Moleküle oder Mikropartikeln feedback-kontrolliert bewegt und positioniert als auch frei in Gruppen gefangen, in ihrer thermischen Bewegung beeinflusst und in vorgebaren Mikrovolumina positioniert bzw. zentriert werden können. Dies soll insbesondere zur Laserspektroskopischen Vermessung und gesteuerten Aggregation von Molekülen, vor allem Makromolekülen, Viren, Bakterien und lebenden Zellen genutzt werden.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß der unabhängigen Ansprüche gelöst, indem an eine mikroskopisch kleine (Mikrometer- und Submikrometerbereich) Multielektrodenanordnung phasenverschoben Hochfrequenzsignale angelegt werden, die feedback-gesteuert mit einem, im zeitlichen Mittelwert wirksam werdenden, Gleichspannungsanteil beaufschlagt werden können. Während die Wechselspannung über die Hochfrequenzpolarisation negative Dielektrophorese hervorruft und auf diesem Weg Partikeln zentriert, die in ihren dielektrischen Eigenschaften geringere Werte aufweisen als die Umgebungslösung, wird der Gleichspannungsanteil feedback-gesteuert und zur gerichteten Bewegung eines Teilchens benutzt.

Damit sind die Nachteile der o.g. Feldfallenprinzipien (Elektrophorese- und Dielektrophoreseprinzip) aufgehoben. Das Teilchenkäfigprinzip ist insbesondere geeignet zur Zentrierung, Sammlung, Fokussierung, oszillatorischen Bewegung von mikrometer- und submikrometergroßen Teilchen, wie Molekülen, Zellen, Mikropartikeln.

Die Hauptanwendungsgebiete liegen in der optischen Spektroskopie, dem Nachweis von Stoffen extrem geringer Konzentration in Lösungen, aber auch in der medizinisch-technischen und diagnostischen Manipulation und Bewegung von Zellen.

Der Vorteil dieses Prinzips besteht darin, daß jeweils ein Teilchen allein, und/oder Vielzahl von Teilchen individuell feedback-gesteuert bewegt werden kann, bei gleichzeitiger Fokussierung aller Teilchen in einem definierten Raumbereich. Das ist deshalb von ausschlaggebender Bedeutung und eine neue Qualität des Teilchen-Trapings, weil auf diesem Wege die Aufenthaltswahr-

scheinlichkeit der Teilchen in einem mikroskopischen Raumbereich trotz thermischer Stöße deutlich erhöht wird, so daß dadurch eine feedback-Steuerung, also das im Beobachtungsbereich halten, deutlich verbessert wird.

Die Mikrostrukturen sind zweckmäßigerweise mit den Methoden der Halbleitertechnologie in planarer und 3-dimensionalen Form im Größenbereich von Mikrometern und Submikrometern auszuführen. Da sind scharfe Ecken, Spitzen und Kanten anzustreben. Als Substrat bietet sich Glas, Silizium, auch Halbleiter, Keramik, Plastik u.ä. an. Die applizierten Spannungen liegen im mV- bis V-Bereich und können über handelsübliche Generatoren erzeugt werden. Je nach Elektrodenstrukturen kann eine Genauigkeit der Manipulation im Submikrometerbereich erreicht werden.

Das Prinzip und die Vorrichtung erläutern Beispiele sind im folgenden beschrieben:

Fig. 1 zeigt eine Oktupolanordnung, in deren Zentralbereich Teilchen, die kleiner als der Elektrodenabstand sind, gefangen werden können. Durch die Signale 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 und 18 an den jeweiligen gleichbenannten Elektroden werden die Teilchen im Feldkäfig über dielektrophoretische Kraft in den Zentralbereich gedrückt. Ein optisches System liefert Daten über eines der Teilchen und seine Bewegungsrichtung. Durch Beaufschlagung eines oder mehrerer Elektroden mit einer Gleichspannungskomponente kann dieses Teilchen in Richtung dieser Elektroden oder entgegengesetzt zu ihnen bewegt werden.

In Fig. 2 sind Möglichkeiten der Erzeugung von im zeitlichen Mittel einer Periode der HF-Spannung auftretende Gleichspannungsanteile bei Wechselspannungssignalen zusammengestellt.

Das Signal (21) weist ein asymmetrisches Taktverhältnis auf. Signal (22) ist bei gleichem Taktverhältnis gegenüber der Nulllinie verschoben. Signal (23) ist durch verschiedene Signalformen oberhalb und unterhalb der Nulllinie charakterisiert. Signal (24) zeigt kurze Gleichspannungsanteile in einem sonst symmetrischen Signal. Die Hochfrequenz liegt in der Regel im MHz-Bereich, die Dauer der feedback-Signale bei einigen Millisekunden bis zu wenigen 100 ms.

Patentsprüche

1. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, dadurch gekennzeichnet, daß die elektromagnetischen Felder durch phasenverschobene, hochfrequente Wechselspannungssignale gebildet werden, die mit einem Gleichspannungsanteil überlagert sind, der in bezug auf die Position der Mikropartikeln feedback-gesteuert ist und im zeitlichen Mittel über mindestens eine Periode der Hochfrequenzsignale auftritt.
2. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gleichspannungsanteil an einer oder mehreren Elektroden einer Multielektrodenanordnung durch Anheben oder Absenken des Wechselspannungssignals durch eine

beaufschlagte Gleichspannung, ein asymmetrisches Taktverhältnis des Hochfrequenzsignals, Signalsymmetrie der beiden Halbwellen einer Periode des Hochfrequenzsignals oder/und Modulation des Hochfrequenzsignals mit einem niederfrequenten Signal erzeugt wird.

3. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplituden einzelner Hochfrequenzsignale periodischen Änderungen unterworfen werden, damit eine periodische Bewegung der Mikroteilchen erzeugt wird.

4. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die feedback-Steuersignale über eine optische elektrische oder fluorimetrische Positionsbestimmung des zu bewegenden Teilchens gewonnen werden.

5. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Viskosität des Mediums zwischen den Elektroden der Mikrostrukturen erhöht wird bis hin zu gelartigen oder polymeren Zuständen.

6. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Flüssigkeit zwischen Elektroden tiefgekühlt wird bzw. aus einem bei niedrigen Temperaturen verfülgigen Gas besteht.

7. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein rotierendes Feld mit einem Gleichspannungsanteil feedback-gesteuert beaufschlagt wird.

8. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl alternierende als auch rotierende Hochfrequenzfelder sowie Gleichspannungsanteile in einem Multielektrodenraum appliziert werden.

9. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen elektrischen Felder gleichzeitig oder alternierend verwendet werden.

10. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewe-

gung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen elektrischen Signale partiell über unterschiedliche Elektroden in die Flüssigkeit eingekoppelt werden.

11. Verfahren zum Trapping und/oder zur Bewegung von Mikropartikeln, insbesondere von Molekülen oder mikroskopischen biologischen Objekten, in Mikrostrukturen, die käfigartige elektromagnetische Felder erzeugen, gemäß den Ansprüchen 1 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zu den elektrischen Feldkäfigen optisch induzierte Kräfte und/oder Lösungsgradienten und/oder Temperaturgradienten und/oder Leitfähigkeitsgradienten und/oder Mikroströmungen zur Haltung der/des Teilchen(s) genutzt werden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

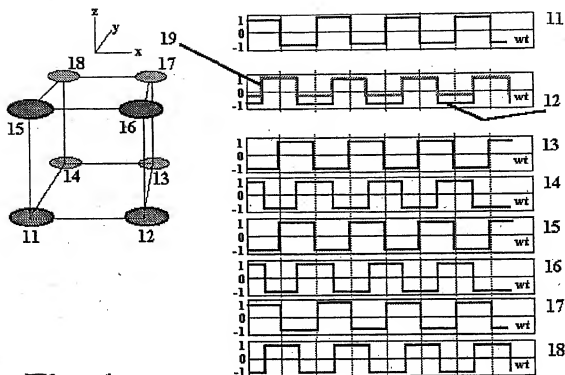
45

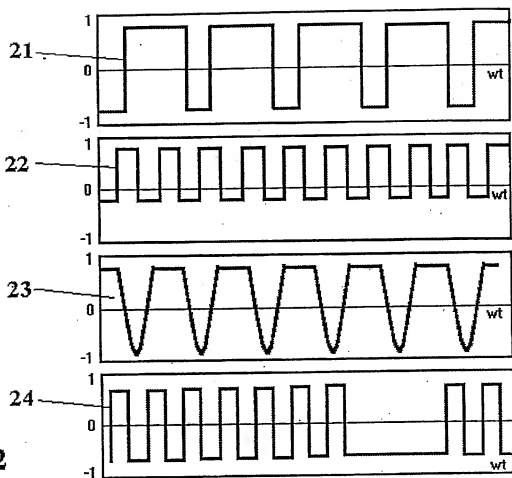
50

55

60

65

**Fig. 1**

**Fig. 2**

US Patent Application based on PCT/EP2004/002774
"METHODS AND DEVICES FOR SEPARATING PARTICLES IN A LIQUID
FLOW"

Summary of DE 195 00 683

DE 195 00 683 discloses a method for trapping and positioning of charged molecules and/or microparticles by a combination of feedback-controlled dc signals or low frequency signals with high frequency signals in 3-dimensional microelectrode structures. By the combination of dielectric forces induced by the high frequency signals and electrophoretic forces induced by the dc components, molecules and microparticles are positioned or/and moved in a liquid medium with a precision of μm or better. The technique disclosed in DE 195 00 683 is applied in optical or electrical equipments for investigating corresponding particles. DE 195 00 683 does not disclose the step of guiding of particles with different electrical, magnetic or geometric properties into different flow areas in a micro channel of a fluidic microsystem as claimed in the above U.S. patent application.